



Osaamista
ja oivallusta
tulevaisuuden
tekemiseen

Minna Sassi

Enterohemorragisen *Escherichia coli* tunnistaminen SHIBAM-maljalta

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioanalytiikan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

30.3.2020

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Minna Sassi Enterohemorragisen <i>Eshcerichia colin</i> tunnistaminen SHIBAM-maljalta 23 sivua + 3 liitettä 30.3.2020
Tutkinto	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Laboratorioanalytiikka
Ohjaajat	erikoistutkija Ulla-Maija Nakari johtava asiantuntija Saara Salmenlinna lehtori Jarmo Palm
<p>Shiga-toksiinia tuottava enterohemorraginen <i>Eshcerichia coli</i> (EHEC) on rajuja suolistotulehduksia ja veriripulia aiheuttava bakteeri, joka pahimmillaan saattaa johtaa munuaisten toimintahäiriöihin, hemolyyttis-ureemiseen oireyhtymään (HUS) ja jopa kuolemaan.</p> <p>EHEC-bakteeri on zoonoottinen, eli infektio voi tarttua eläimestä ihmiseen ja toisin päin. EHEC-bakteerin säilymönä toimivat erityisesti nautojen, mutta myös lampaiden, vuohien ja jopa lintujen suolisto. Tartunnan lähteinä yleensä toimivat ulosteella kontaminoitunut pastöroimaton maito tai vihannekset, raaka tai huonosti kypsennetty liha ja myös ristikontaminaation kautta bakteeri voi joutua veteen tai muihin elintarvikkeisiin. Tartunta leviää helposti myös käsien välityksellä henkilöstä toiseen, vain 10–100 bakteeria riittää aiheuttamaan infektion.</p> <p>EHEC-bakteerin aiheuttama tauti luokitellaan yleisvaaralliseksi tartuntataudiksi ja kuuluu turvaluokan 3 mikrobeihin. Tartunnasta on ilmoitettava Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen ylläpitämään tartuntatautirekisteriin.</p> <p>Opinnäytetyö toteutettiin Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen asiantuntijamikrobiologian yksikössä. Opinnäytetyön tavoitteena on parantaa EHEC-bakteerin tunnistamista maljalta ja näin nopeuttaa hidasta ja monivaiheista työnkulkua.</p> <p>Työssä testattiin 27 kappaletta sekaviljelmänä tulleita kantoja, jotka viljeltiin kaupalliselle SHIBAM-maljalle ja analysoitiin vielä PCR-menetelmällä. Seitsemästä näytteestä saatiin EHEC-bakteeri eristettyä. Vaikka oikean pesäkkeen tunnistaminen oli edelleen haastavaa, EHEC-bakteerin vaihtelevan morfologian takia, olivat pesäkkeet kuitenkin helpommin tunnistettavia kuin ORI-maljalla. SHIBAM-maljaa voisi jatkossa hyödyntää haastavien kantojen eristämisessä.</p>	
Avainsanat	EHEC, E. coli, hemolyysi, SHIBAM, Shiga-toksiini

Author Title	Minna Sassi Identification of Enterohemorrhagic <i>Eshcerichia coli</i> from a SHIBAM Plate
Number of Pages Date	23 pages + 3 appendices 30.3.2020 March 2020
Degree	Laboratory Sciences, Bachelor's Degree
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Ulla-Majja Nakari, Senior Researcher Saara Salmenlinna, Chief Specialist Jarmo Palm, Senior Lecturer
<p>The Shiga toxin-producing Enterohemorrhagic <i>Eshcerichia coli</i> (EHEC) is a bacterium that causes severe intestinal inflammation and diarrhea, which at worst can lead to renal dysfunction, hemolytic uremic syndrome (HUS) and even death.</p> <p>The EHEC bacterium is zoonotic, meaning that an infection can be transmitted from animal to human and vice versa. The intestine preserves EHEC, especially in cattle, but also in the intestines of sheep, goats and even birds. The sources of infection are usually faecal-contaminated unpasteurised milk or vegetables, raw or poorly cooked meat, and also through cross-contamination the bacterium can get into water or other foods. The infection also spreads easily from person to person, only 10 to 100 bacteria are enough to cause the infection.</p> <p>The disease caused by the EHEC bacterium is classified as a major communicable disease and is classified as Risk Group 3 microbes. The infection must be reported to the communicable disease register maintained by the Finnish Institute for Health and Welfare.</p> <p>The thesis work was carried out at the Department of Expert Microbiology, Department of Intestinal Bacteria of the Finnish institute for for health and welfare. The aim of this thesis work was to improve the identification of the EHEC bacterium in the plate and thus to speed up the slow and multistage workflow.</p> <p>The work involved testing 27 strains of the mixed plate cultured on a commercial SHIBAM plate and these were further analyzed by PCR. EHEC was isolated from seven samples. Although the identification of the right colony was still challenging due to the variable morphology of the EHEC bacterium, the colonies were nevertheless more easily identifiable than the ORI plate.</p>	
Keywords	EHEC, E. coli, hemolysis, SHIBAM, Shiga-toxin

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Shiga-toksiineja tuottava <i>Escherichia coli</i>	2
2.1	Patogeenisten <i>E. coli</i> -bakteerien luokittelu	2
2.2	Enterohemorragisen <i>E. coli</i> n aiheuttama infektio	3
2.3	Shiga-toksiini	4
3	Testattava SHIBAM-malja ja hemolyysi	6
4	Reaaliaikainen polymeerasiketjureaktio	7
4.1	Polymeerasiketjureaktion eri vaiheet ja menetelmät	7
4.2	Käytetty testausmenetelmä ja sen periaate	8
5	Työn suoritus	9
5.1	Näytteen esikäsittely	9
5.2	PCR	10
5.3	PCR-ajon tulosten tulkinta	11
5.4	Laimennossarjan teko SHIBAM-maljalle viljely	12
6	Tulosten yhteenveto	15
7	Loppupäätelmä	21
	Lähteet	24

Liitteet

Liite 1. Alukkeet ja koettimet

Liite 2. Oligo-mix

Liite 3. Työnkulun kaavio

Lyhenteet

DAEC	Diffuusisti adheroituva <i>Escherichia coli</i> , ripulia aiheuttava <i>Escherichia coli</i> -bakteeri
DNA	Deoksiribonukleiinihappo, nukleiinihappo, joka sisältää kaikkien eliöiden solujen geneettisen materiaalin.
dNTP	Deoxynucleotide triphosphate, eli deoksinukleotidit joita käytetään PCR-menetelmässä rakentamaan uuden DNA-juosteen yksittäisistä dNTP-molekyyleistä.
EAEC	Enteroaggregatiivinen <i>Escherichia coli</i> , tyypillinen turistiripulia aiheuttava <i>Escherichia coli</i> -bakteeri.
EHEC	Enterohemorraginen <i>Escherichia coli</i> , shigatoksiineja tuottava <i>Escherichia coli</i> -bakteeri, joka on yleinen kaikissa teollisuusmaissa.
EIEC	Enteroinvaasinen <i>Escherichia coli</i> , esiintyy erityisesti matalan tulotason maissa ja Suomessa tavataan satunnaisesti näihin maihin tehtyjen matkojen jälkeen.
EPEC	Enteropatogeeninen <i>Escherichia coli</i> , esiintyy erityisesti matalan tulotason maissa ja Suomessa tavataan satunnaisesti näihin maihin tehtyjen matkojen jälkeen.
ETEC	Enterotoksigeeninen <i>Escherichia coli</i> , tyypillinen turistiripulia aiheuttava <i>Escherichia coli</i> -bakteeri ja yleinen syy lasten ripuliin matalan tulotason maissa.
HUS	Hemolyyttis-ureeminen syndrooma, EHEC-bakteerin aiheuttama oireyhtymä joka voi aiheuttaa mm. punasolujen hajoamista ja munuaisten toimintavajasta.
LEE	Locus of enterocyte effacement, <i>E. coli</i> -bakteerin patogeenisuusareke, joka sisältää mm. proteiineja määräävät eae-geenit, joiden avulla EHEC-bakteerin kiinnittyy suolen epiteeliin.

PCR	Polymerase Chain Reaction, molekyylibiologinen menetelmä jolla saadaan monistettua eksponentieaalisesti tutkittavaa DNA-fragmenttia tai yksittäistä geeniä.
rRNA	Ribosomaalinen ribonukleiinihappo, RNA-tyyppi joka on osa ribosomin rakennetta.
SHIBAM	STEC Heart Infusion washed Blood Agar with Mitomycin C, kaupallinen mitomysin C:tä sisältävä veriagarmalja.
VTEC	Verotoxin-producing <i>Escherichia coli</i> , verotoksiineja eli shiga-toksiineja tuottava <i>Escherichia coli</i> -bakteeri.

1 Johdanto

Enterohemorraginen *Esherichia coli* (EHEC) on vakavia suolistotulehduksia aiheuttava bakteeri. Oireina ilmenee muun muassa voimakasta veriripulia, ja noin 10 %:lle saattaa kehittyä vakava munuaisten toimintahäiriö, hemolyyttis-ureeminen oireyhtymä (HUS), joka saattaa johtaa pysyvään munuaisvaurioon ja jopa kuolemaan. [1;2.]

EHEC-bakteeri löydettiin vuonna 1982 Yhdysvalloissa, jolloin EHEC-bakteeri onnistuttiin eristämään ensimmäistä kertaa ulosteesta veriripuliepidemian yhteydessä. Suomessa todettiin 90-luvun alussa muutamia varmistettuja tapauksia ja EHEC-bakteerin esiintymistä on seurattu vuodesta 1994 lähtien. Ensimmäinen EHEC-epidemia puhkesi Suomessa vuonna 1997 Etelä-Pohjanmaalla, jolloin todettiin 17 mikrobiologisesti varmistettua tapausta. Epidemia sai alkunsa uimarannalta, jossa pikkulapset nielivät kontaminoitunutta vettä. Tartunnanlähde ei koskaan saatu selvitettyä. Vuonna 2018 tartuntatautirekisteriin ilmoitettiin 213 EHEC-bakteerin aiheuttamaa tautitapausta. [1; 3.]

EHEC-bakteeri on zoonoottinen ja esiintyy erityisesti nautakarjan mutta myös lampaiden, vuohien ja jopa lintujen suolistossa. Eläimet ovat täysin oireettomia, ja yleensä tartunnan lähteinä toimivat ulosteella kontaminoitunut pastöroimaton maito sekä kasvikset, raaka tai huonosti kypsennetty liha, ja myös ristikontaminaation kautta bakteeri voi joutua myös veteen tai muihin elintarvikkeisiin. Infektioannos on pieni, 10–100 bakteeria riittää, joten EHEC-infektio tarttuu helposti myös ihmisestä toiseen, jos käsihygienia on puutteellista. [1; 4.]

EHEC-bakteerin aiheuttama tauti luokitellaan yleisvaaralliseksi tartuntataudiksi (tartuntatautilaki 4§ ja VN asetus tartuntataudeista) ja kuuluu turvaluokan 3 mikrobeihin. Tartunnasta on ilmoitettava Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksen tartuntatautirekisteriin. [8].

Opinnäytetyön toimeksiantajana toimi Terveiden ja hyvinvoinnin laitos ja työ toteutettiin asiantuntijamikrobiologian yksikössä. Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksen tehtävä on ylläpitää valtakunnallista tartuntatautirekisteriä Tartuntatautilakiin ja -asetukseen perustuen, ohjata ja tukea epidemioiden selvittämistä kunnissa ja sairaanhoitopiireissä, sekä tuottaa epidemiaselvityksiä. [9]

Opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää EHEC-bakteerikantojen tunnistuksessa ja eristämässä käytettyjä menetelmiä. EHEC-infektion mikrobiologisessa diagnostiikassa on omat haasteensa muuttuneiden testausmenetelmien takia. EHEC-kannan tunnistaminen perustuu ensisijaisesti stx1- ja stx2-geenien toteamiseen PCR:llä sekä serotyypitykseen agglutinoimalla antiseerumeilla. Tarkempi työnkulun kuvaus löytyy liitteestä 2. PCR voidaan tehdä myös sekaviljelmästä, mutta kannan eristäminen puhdasviljelmäksi on tehtävä jatkotoimenpiteitä, kuten kokogenomisekvenssointia varten. Kliiniset mikrobiologian laboratoriot lähettävät THL:een EHEC-bakteeria sisältäviä sekaviljelmiä. EHEC-bakteerin eristäminen puhdasviljelmäksi sekaviljelmästä on haastavaa, sillä EHEC-bakteeria saattaa olla erittäin vähän ja kasvusto näyttää samalle kuin ei-patogeeninen *E. coli*. Tässä työssä testataan kaupallista selektiivistä SHIBAM-maljaa EHEC -kantojen löytämiseksi.

2 Shiga-toksiineja tuottava *Escherichia coli*

Enterobacteriaceae-heimoon ja *Escherichia*-sukuun kuuluva *Escherichia coli* on gram-negatiivinen enterobakteeri. *E. coli* on yksi vallitsevista fakultatiivisesti anaerobisista ihmisten suoliston normaalimikrobistoon kuuluvista lajeista ja yleensä vaaraton isännälle. Nämä pitävät yllä suoliston bakteeritasapainoa estämällä patogeenisempia mikrobeja kolonisoimasta suolta. Enterobacteriaceae-heimossa on useita läheistä sukua toisilleen olevia kantoja, ne muistuttavat paljon myös toisiaan solunsa hienorakenteen suhteen. Ryhmään kuuluu ei-patogeenisiä kantoja sekä kantoja joilla on samantyyppinen aineenvaihdunta, mutta laaja valikoima virulenssitekijöitä. Geeninvaihtoa tapahtuu eri lajien välillä, ja *E. coli* -bakteerista tunnetaan jo yli 700 patogeenistä serotyyppiä, mikä kertoo bakteerien nopeasta evoluutiosta. [2; 3; 4; 10.]

2.1 Patogeenisten *E. coli* -bakteerien luokittelu

Patogeeniset *E. coli* -bakteerit luokitellaan ja tunnistetaan niiden virulenssitekijöiden perusteella. Patogeenisten ryhmään kuuluvat enterohemorraginen EHEC, enterotoksiininen ETEC, enteropatogeeninen EPEC, enteroinvaasinen EIEC, enteroaggregatiivinen EAEC sekä diffuusisti adheroituvat DAEC-kannat. Yksi patogeenisten ryhmään kuuluvista *E. coli* -kannoista on hankkinut kyvyn tuottaa Shiga-toksiineja. Näitä kutsu-

taan monilla eri nimillä, kuten enterohemorraginen *E. coli* (EHEC), verotoksiinia tuottava *E. coli* (VTEC) tai Shiga-toksiineja tuottava *E. coli* (STEC). [2; 3; 4; 10.]

EHEC-kannoille voidaan määrittää vasta-aineperusteisella tyypityksellä serotyyppi O- ja H-antigeenien mukaan. O-antigeeni viittaa bakteerikannan soluseinän lipopolysakkarideihin. H-antigeenit viittaavat bakteerin uintisiimaan eli flagelloihin, joiden avulla bakteerit liikkuvat. Yleisin vakavia epidemioita aiheuttava EHEC-serotyyppi on O157:H7, muita kantoja ovat O26, O45, O91, O103, O128 ja O148. Seroryhmä O157 eroaa fenotyyppisesti muista *E. colista* niin että O157 fermentoi sorbitolia hitaasti tai ei lainkaan. [2; 4; 10.]

EHEC-bakteeri ei tunkeudu paksusuolen epiteelisolujen sisään, vaan kiinnittyy ihmisten soluihin pienillä tahmeilla värekarvoilla, joita kutsutaan fimbria-adhesiineiksi. Karvojen päissä olevien proteiinien avulla ne voivat kiinnittyä tiettyyn ihmisolun spesifiseen reseptoriin. Tämä ominaisuus edes auttaa Shiga-toksiinin imeytymistä soluihin ja vaikuttaa isäntäsolun toimintaan injektoimalla siihen proteiineja tyypin kolme erityisjärjestelmän (T3SS) kautta. Locus of enterocyte effacement eli LEE-patogeenisuussaareke sisältää virulenssiin vaikuttavia geenejä, jotka koodaavat tyypin kolme erityisjärjestelmää ja sen kautta injektoitavia proteiineja. Yksi tärkeistä virulenssiin vaikuttavista geeneistä on polymeerasiketjureaktiolla (PCR) tutkittava eaeA-geeni. [11; 12.]

2.2 Enterohemorragisen *E. coli* aiheuttama infektio

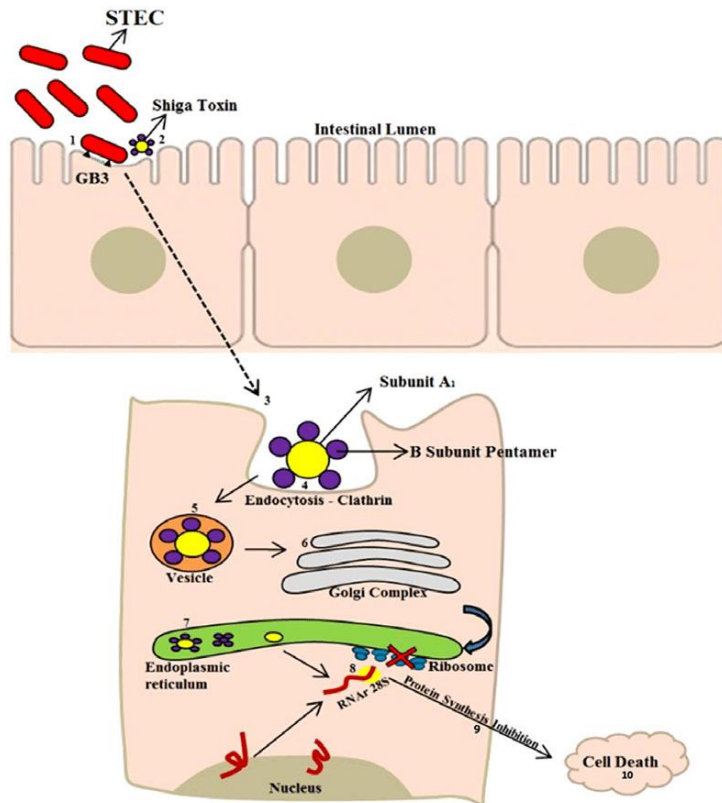
Enterohemorragiset *E. coli* -kannat (EHEC) aiheuttavat voimakasta veriripulia. Taudin itämisaika vaihtelee 2–14 päivään, ja ripuli kestää tavallisesti 4–10 vuorokautta. Oireina esiintyy vatsakramppeja ja ripulia, ja ripuli muuttuu muutamassa päivässä veriseksi (hemorraaginen koliitti). Normaalisti tauti menee ohi itsestään noin kahdeksassa päivässä. Kuitenkin osalle noin 5–10 %:lle sairastuneista voi kehittyä hemolyyttis-ureeminen oireyhtymä eli HUS. HUS aiheuttaa punasolujen hajoamista (hemolyyttinen anemia), sekä verihiutaleiden määrän laskua (trombosytopenia), joka saattaa johtaa pysyvään munuaisvaurioon ja jopa kuolemaan. Erityisesti pienet lapset ja vanhukset ovat alttiita infektion vaikeampiin muotoihin. Infektio voi olla myös oireeton. HUS-potilaista 3–4 %:lle kehittyä terminaalinen uremia, jolloin munuaisten siirto on välttämätön. Kuolleisuus taudin vaikeaan muotoon on noin 5 %. Antibiooteista taudin taltuttamisessa ei ole hyötyä, vaan antibioottihoito voi paradoksaalisesti lisätä sairauden vaka-

vuutta stimuloimalla bakteeria vapauttamaan enemmän toksiiinia ja voimistaen tulehdusreaktiota. [1; 3; 5; 6; 10.]

2.3 Shiga-toksiini

Shiga-toksiineiksi kutsutaan kaikkia toksiiineja, jotka ovat toiminnaltaan ja rakenteeltaan samankaltaisia kuin *Shigella dysenteriae* -bakteerin tuottama Shiga-toksiini (Stx). Nämä toksiiinit kuuluvat laajaan kasvien ja bakteerien tuottamaan toksiiiniperheeseen. Shiga-toksiini on eksotoksiini. Eksotoksiinit ovat proteiineja, jotka vaikuttavat spesifisti tiettyissä kudoksissa tiettyihin solurakenteisiin tai toimintoihin. [12; 15.]

EHEC-kantojen tuottamat toksiiinit jaetaan kahteen pääryhmään: Stx₁ ja Stx₂. Shiga-toksiinit ovat 70 kDa:n suuruisia, joista A-osa 32 kDa ja jokainen B-osa noin 7,7 kDa. *Shigellan* ja EHEC-kantojen tuottamat Stx₁-toksiinit ovat rakenteeltaan hyvin samanlaisia ja eroavatkin vain yhden aminohapon suhteen. Stx₂ ja sen variantit kuitenkin poikkeavat Stx₁-toksiinista ja toisistaan B-yksiköiden aminohapposekvenssin osalta, mikä vaikuttaa toksiinien kykyyn sitoutua solukalvon reseptoreihin, mikä taas vaikuttaa suoraan toksiinien patogeenisyyteen. Kuvassa 1 on kuvattu Shiga-toksiinin vaikutusmekanismi tarkemmin. [9; 10.]



Kuva 1. Shiga-toksiinin vaikutusmekanismi. (1) Bakteerin sitoutuminen solun gb3-kerrokseen. (2) Shiga-toksiinin tuotanto. (3) Shiga-toksiinien kulkeutuminen Golgi-kompleksiin. (4) Toksiinin klatriinivälitteinen endosytoosi solussa. (5) Klatriinin peittämien rakkuloiden muodostuminen. (6) Toksiini kuljetetaan Golgi-kompleksiin. (7) Vesikkelin eli kalvorakkulan rikkoutuminen ja pentameerin B erottaminen myrkyllisestä A1-alayksiköstä. (8) A1-alayksikön vaikutus rRNA:han 28S-osassa, jossa N-glukosidaasi korvaa adeniniosan. (9) RNA:n kääntäminen ei onnistu. (10) Apoptoosi eli solukuolema. Kuva: Wiley Online Library. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1541-4337.12302> [15].

Shiga-toksiinin rakenne on muotoa AB₅. B-alayksikkö koostuu viidestä identtisestä pentameerista, ja A-alayksikkö on entsyymi. Kuvasta 1 voidaan nähdä miten B-alayksiköt sitoutuvat ensin suoliston, munuaisten ja verisuonten epiteeleillä sijaitseviin spesifisiin Gb3-glykolopidireseptoreihin ja Shiga-toksiinit kulkeutuvat klatriinivälitteisellä endosytoosilla solun sisälle, muodostaen klatriinin peittämiä vesikkeleitä eli kalvorakku- loita. Toksiini kuljetetaan Golgi-kompleksiin, jossa vesikkeli rikkoutuu ja B-pentameerit irtoavat myrkyllisestä A-entsyymistä. A-entsyymi sitoutuu ribosomiin muuttaen solun toimintaa pysäyttäen proteiinisynteesin rRNA:n 28s-osassa irrottamalla adeniniin ja korvaamalla sen N-glukosidaasilla. Tämä johtaa erityisesti endoteelisolujen apoptoosiin eli solukuolemaan, ja seurauksena on suoliston limakalvon vaurioituminen. Shigatok-

siinit siirtyvät suoliston vaurioituneesta kohdasta verenkiertoon ja voivat päätyä esimerkiksi munuaisiin joissa on runsaasti Stx-reseptoreita. Toksiinit vaurioittavat munuaiskappillaareja ja nefroneita, mikä johtaa molempien munuaisten vajaatoimintaan. Shiga-toksiinit ovat helposti liukenevia, joten ne kulkeutuvat nopeasti ympäri kehoa. [12; 15.]

3 Testattava SHIBAM-malja ja hemolyysi

SHIBAM-malja eli STEC Heart Infusion Blood Agar with Mitomycin C on mitomycin C:tä ja pestyjä defibrinoituja lampaan punasoluja sisältävä selektiivinen malja ja soveltuu pääasiassa non-O157 -patogeenisten pesäkkeiden seulontaan. Taulukossa 1 on eritelty tarkemmin maljoissa käytetyn elatusaineen sisältö. Pestyjä lampaan punasoluja sisältävissä elatusaineissa enterohemolysiiniä tuottavat bakteerit muodostavat β -hemolyyttisiä pesäkkeitä. Tutkimusten mukaan enterohemolysiinin tuotto *E. coli* -bakteerissa korreloi voimakkaasti Shiga-toksiinin tuotannon kanssa. Myös *Listeria spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Serratia marcescens*, *Edwardisiella tarda* ja *Bacillus cereus* -kannat voivat tuottaa β -hemolyyttistä kasvua. [3; 13.]

Taulukko 1. Kaupallisen Hardys Diagnosticin SHIBAM-maljan koostumus.

Ainesosat	Ainemäärät
Agari	14,0 g
Peptoni	17,0 g
Natriumkloridi	5,0 g
Tryprtoni	5,0 g
Hiivauute	4,0 g
Kalsiumkloridi	1,47 g
Mitomysin C	0,5 g
Pesty defibrinoitu lampaan veri	40 ml
Deionisoitu vesi	1000 ml

E. coli -kannoissa on tunnistettu neljä eri hemolysiiniyyppiä: α -hemolysiini (hlyA), enterohemolysiini (ehxA, e-hlyA) ja hiljainen (piilevä) hemolysiini (sheA). Enterohemolyyysi havaitaan yleensä yön yli inkuboinnin jälkeen vain pestyjä punasoluja sisältävissä ve-

riagareissa. Alfa-hemolyysi havaitaan jo 3–6 tunnin jälkeen normaaleissa veriagar-maljoissa. [3; 13]

Hemolyysillä tarkoitetaan punasolujen hajoamista. Punasolujen hajoaminen tapahtuu S- ja O-hemolysiinien avulla. O-hemolyysi (SLO) on happilabiili eli epävakaata ja S-hemolysiini (SLS) on happistabiili eli happivakaata. Nämä hemolysiinit ovat eksotoksiineja ja aiheuttavat hemolyyssireaktion. Hemolyyssireaktio aiheuttaa verimaljalla pesäkkeiden ympärillä punasolujen hajoamisesta johtuvaa eriasteista kirkastumista. Hemolyyssiä on kolmea eri tasoa. β -hemolyysi on kirkkain ja voimakkain hemolyyssi, ja siinä punasolut hajoavat täydellisesti ja valo läpäisee maljan β -hemolyyttiset alueet. α -hemolyyssissä punasolut hajoavat epätäydellisesti ja se näkyy vihreänä hemolyyssinä. Vihertävä väri johtuu bakteerin tuottamasta vetyperoksidista, joka hapettaa punasolujen hemoglobiinin methemoglobiiniksi. Non-hemolyyssissä eli γ -hemolyyssissä punasolut eivät hajoa, eikä hemolyyssiä ole havaittavissa lainkaan. [11]

4 Reaaliaikainen polymeerasiketjureaktio

Reaaliaikainen polymeerasiketjureaktio (real-time polymerase chain reaction) eli PCR on in vitro -menetelmä jossa kahden nukleotidisekvenssiltään tunnetun alueen välissä olevaa DNA-sekvenssiä monistetaan lämpötilavaihtelun avulla. Reaaliaikaisessa menetelmässä tuotteen määrää voi seurata reaktion edetessä. PCR koostuu kolmesta vaiheesta, denaturaatio-, annealing- ja ekstensiovaiheesta. Nämä vaiheet muodostavat yhden syklin ja yhden syklin aikana geeni monistuu eksponentiaalisesti, eli ensimmäisen syklin aikana kahdesta yksijuosteisesta DNA-nauhasta syntyy neljä kopiota.

4.1 Polymeerasiketjureaktion eri vaiheet ja menetelmät

Ensimmäisessä eli denaturaatio-vaiheessa kaksijuosteinen kohde-DNA eli templaatti denaturoidaan yksijuosteiseksi ~ 95 °C:n lämpötilassa. Annealing- eli alukkeiden tarttumisvaiheessa PCR-reaktioseoksen lämpötila lasketaan alukkeiden nukleotidisekvenssistä riippuen 45 – 65 °C:seen. Alukkeiden kiinnittymisen jälkeen lämpötilaa nostetaan ~ 75 °C:seen, ja tätä kutsutaan DNA:n synteesi- eli ekstensiovaiheeksi. Ekstensiovaiheessa DNA-polymeerasi alkaa kiinnittää reaktioseoksessa olevia nukleotideja alukkeiden kiinnittymiskohdista lähtien. [16]

Reaaliaikainen PCR-menetelmä perustuu fluoresoivan merkkiaineen käyttöön, ja signaalit voidaan mitata kahdella eri tavalla. Ensimmäisessä menetelmässä käytetään kaksinauhaiseen DNA:han sitoutuvaa fluoresoivaa väriainetta. Fluoresenssi moniker-taistuu väriaineen sitoutuessa valmistuvaan PCR-tuotteeseen, ja näin signaalin määrä korreloi DNA:n määrää. Tämän menetelmän ongelma on värin epäspesifisyys, koska väri sitoutuu kaikkeen 2-nauhaiseen DNA:han eikä vain haluttuun kohde-DNA:han. [16]

Toinen menetelmä perustuu fluoresoivan koettimen käyttöön. Koettimet ovat pieniä leimattuja DNA-pätkiä, jotka ovat komplementaarisia kopioitavalle kohteelle. Proximal quenching -menetelmää käytettäessä on useita eri vaihtoehtoja. Esimerkiksi quencher-menetelmässä koettimen 5'-päässä on fluoresoiva leima ja 3'-päässä on leiman sammuttaja. Eksitoitaessa energia siirtyy sammuttajalle, joten irrallaan olevan koettimen fluoresenssi on heikkoa. Signaali voimistuu kohteen sitouduttua ja koettimen sammuttaja irtoaa Taq-polymeraasin 5'-3' -eksonukleaasiaktiivisuuden ansiosta. Taq-polymeeraasi on yleisimmin käytetty DNA-entsyymi, joka on eristetty *Thermus aquaticus* -bakteerista. [16]

Hairpin-metodissa käytetään koetinta, jonka päät liittyvät itsestään yhteen. Kiinnittyneenä sammuttaja estää fluoresenssileiman signaalin ja kun koetin yhdistyy DNA-kohteeseen, se linearisoituu erottaen fluoroflorin sekä sammuttajan ja signaali voimistuu. [16]

4.2 Käytetty testausmenetelmä ja sen periaate

Enterohemorragisen *E. coli*n genomista monistetaan Shiga-toksiini stx₁, Shiga-toksiini stx₂ ja Shiga-toksiini 2:n alatyypit stx_{2f}:n koodaavasta geenistä sekä rfbE-geenistä halutut geenialueet. Jokaiseen geenialueeseen tarttuu spesifinen fluoresoiva koetin, liitteeseen 1 on listattu työssä käytetyt koettimet. [16]

Reagenssit

1. templaatti-DNA
2. aluke-DNA, eli oligonukleotidit, jotka rajaavat monistettavan alueen
3. DNA-polymeraasientsyymi, joka monistaa halutun DNA-pätkän
4. dNTP:t eli oligonukleotidit, joista uusi DNA rakennetaan

5. puskuriliuos, joka muuttaa reaktion olosuhteet otollisiksi DNA:n monistumiselle
6. kationit, jotka vaikuttavat alukkeiden kiinnittymiseen ja konsentraation vahvuus voi vaikuttaa reaktion tarkkuuteen

Koettiin kuuluu kaksi väriainetta, fluoresoiva väri ja hiljentäjä-väri. Tätä yhdistelmää kutsutaan hydrolyysikoettimeksi. Hiljentäjä estää fluoresoivan värin signaalin. Fluoresoiva väriaine vapautuu, ja fluoresenssi voimistuu DNA-polymeraasin pilkkoessa kopioidaan DNA:han kiinnittyneen koettimen. PCR-tuotteen muodostumista voi seurata reaaliaikaisesti eri aallonpituuksia mittaavilta kanavilta: FAM (stx1), HEX (stx2), Cy5 (Stx2f) ja ROX (rfbE). [16]

5 Työn suoritus

Näytteinä käytettiin vanhoja pakastettuja kantoja, joista ei ollut aikaisemmin saatu eristettyä EHEC-bakteeria, sekä uusia näytteitä jotka olivat tuoreita ja joista ei ollut saatu pesäkettä eristettyä primaarimaljalta.

5.1 Näytteen esikäsittely

Pakastetut näytteet viljeltiin ensin maidosta ORI-maljalle (Laboratoriotyön tuki-tiimi, 5328) ja maljat laitettiin inkuboitumaan yön yli + 35 °C:seen. Jokaiseen ajoon otettiin mukaan kolme kontrollia, kaksi kontrollikantaa ja eristyksen vesikontrolli. Kontrollikantojen yksityiskohtaisemmat tiedot löytyvät taulukosta 2.

Taulukko 2. Käytetyt kontrollit ja standardit.

RHE 4270	positiivinen (stx1, stx2 ja rfbE)	ATCC 43895, <i>E. coli</i>
RHE 7097	positiivinen (stx2f)	T4/97, <i>E. coli</i>
vesikontrolli/eristyskontrolli	negatiivinen	

Tuoreiden näytteiden kanssa voitiin siirtyä suoraan näytteiden esikäsittelyyn. Bakteerimassaa suspensoitiin 500 µl:aan steriillä vettä 1,5 ml:n Eppendorf-putkeen. Putkia keitettiin 10 minuuttia 100 asteisessa vesihauteessa, jonka jälkeen putket sentrifugoitiin lyhyesti.

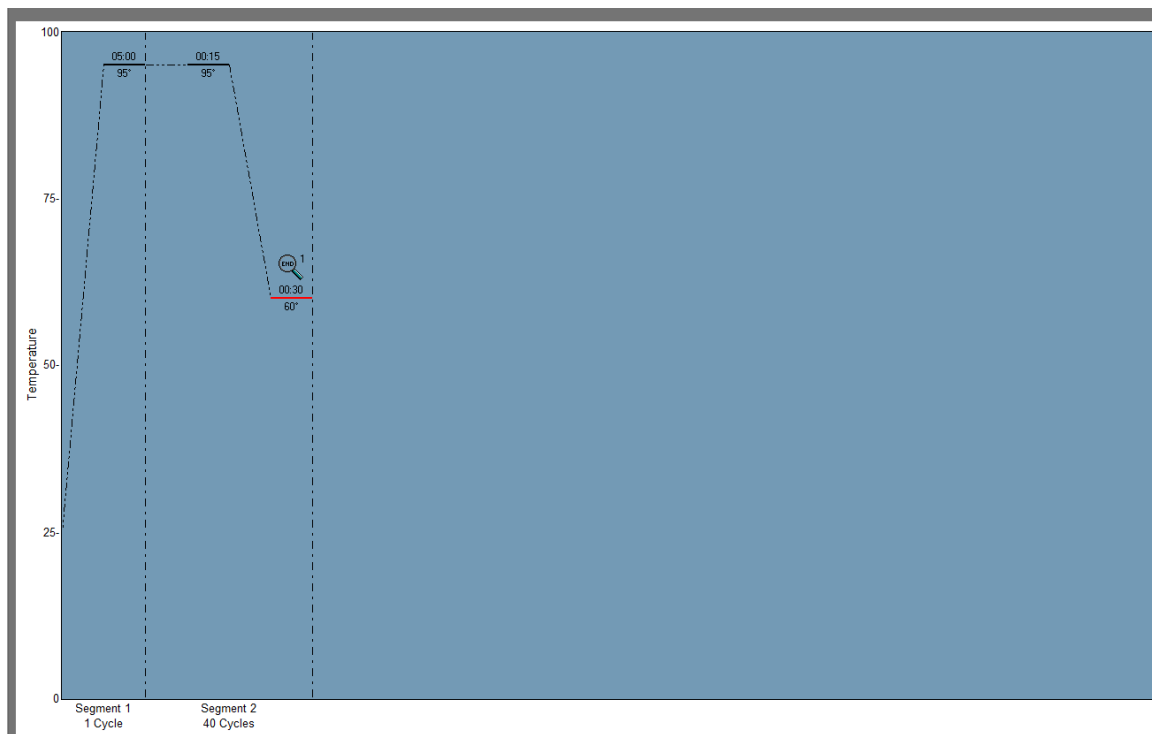
5.2 PCR

Työsuunta PCR-tiloissa on aina puhtaasta tilasta likaisimpaan. Ensin pipetoitiin master-mix -reagenssia 1,5 ml:n Eppendorf-putkeen master-mix-huoneessa. Yhteen reaktioon tarvittiin PCR-vettä 8 µl, Multiplex PCR mastermixiä (Amplidiag™ AD-MM103x2) 10 µl ja EHEC-oligomixiä 1 µl (liite 2.), eli mix-putkeen pipetoitiin seoksen määrä kertaa näytteiden määrä (taulukko 3.).

Taulukko 3. Yhteen reaktioon käytetyt reagenssin ja tarvittavat ainemäärät

Komponentit	Tilavuus per reaktio
PCR-vesi	8 µl
Amplidiagin™ Multiplex Mastermix	10 µl
EHEC-oligoseos	1 µl
DNA-templaatti	1 µl
Yhteensä	20 µl

Seuraavaksi siirryttiin templaatti-huoneeseen ja pipetoitiin kahdeksan kuopan PCR-levylle joka reaktiota kohti 19 µl master-mixiä ja 1 µl DNA-templaattia ja vorteksoitiin lyhyesti. Laitahuoneessa vielä fuugattiin PCR-levyt ennen MxPro-PCR-laitteeseen laittoa.

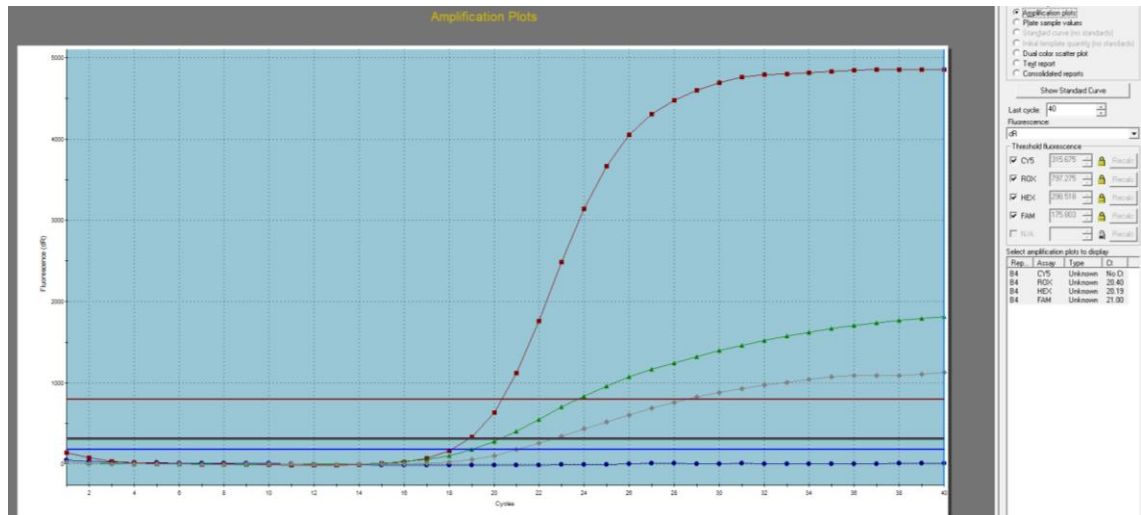


Kuva 2. PCR-ajon ohjelma: 1) Ensimmäisessä syklissä lämpötila nousee 95 °C:seen ja pysyy siinä 5 minuuttia. Tämä vaihe tulee vain kerran ajon alussa. 2) Toisessa syklissä lämpötila pysyy 15 sekuntia 95 °C:ssa ja laskee 30 sekunniksi 60 °C:seen. Sykli 2 toistetaan 40 kertaa.

PCR-levyt asetettiin MxPro-laitteeseen ja valittiin EHEC-ohjelma. Ohjelman ajoaika oli noin 1 h ja 6 minuuttia, ja syklin eri vaiheet toistetaan 40 kertaa, ohjelman tarkempi kuvaus yllä [kuva 2].

5.3 PCR-ajon tulosten tulkinta

Ajon jälkeen tulokset avattiin MxPro-ohjelmassa. Käytettävät kanavat ovat FAM, HEX, ROX ja Cy5, ja kaikille kanaville asetettiin raja-arvo monistuskäyrän mahdollisimman jyrkän nousun kohdalle ja tallennettiin. Tämän jälkeen tarkistettiin kontrollien tulos ja ajo voitiin hyväksyä, jos positiivisten kontrollien Ct-arvot ovat välillä 12–24 ja eristyskontrolli on täysin negatiivinen (No CT). Massan tulos tulkittiin positiiviseksi, jos Ct-arvo yli ≤ 40 ja monistuskäyrä näytti oikeanmuotoiselta nousevalta käyrältä (kuva 3).



Kuva 3. Kuvassa näkyvät FAM- (Stx1), HEX- (Stx2) ja ROX (O157) -käyrät.

5.4 Laimennossarjan teko SHIBAM-maljalle viljely

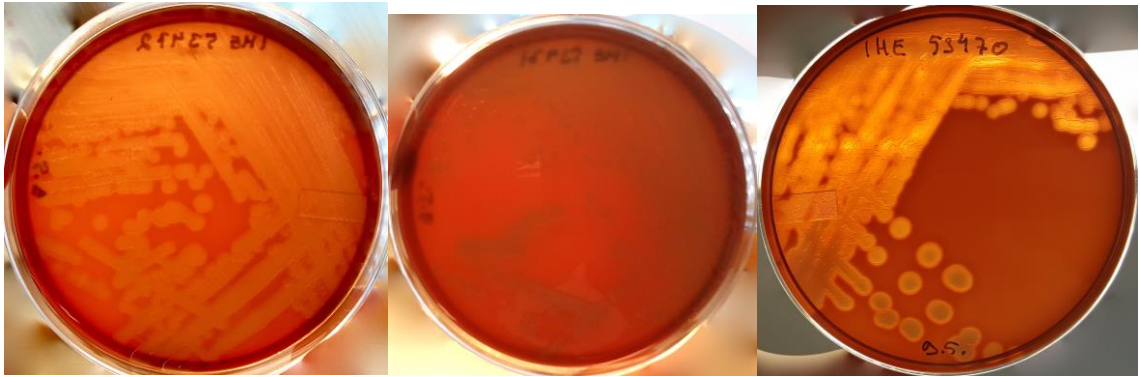
Positiivisen tuloksen saaneista näytteistä tehtiin laimennossarja. Steriiliä vettä pipetoitiin 900 µl 1,5 ml:n Eppendorf-putkeen. Bakteerimassaa suspendoitiin 0-putkeen, jota oli otettu kattavasti eri puolilta maljaa. Pipetoitiin 100 µl sarjan seuraavaan eli -1-putkeen ja vorteksoitiin. Pipetoitiin -1-putkesta 100 µl -2-putkeen ja vorteksoitiin. Tämä toistettiin -5-putkeen asti. Viljelyyn käytettiin laimennoksia -4 ja -5, joistakin -3 jos näyte näytti heikommin kasvaneelta. SHIBAM-maljoille (Hardy Diagnostics, HD-A146) pipetoitiin 50 µl laimennoksia ja levitettiin tasaisesti maljalle. Tarkoituksena oli saada mahdollisimman paljon erillis-pesäkkeitä. Maljoja inkuboitiin yön yli + 35 °C:ssa.

Pesäkkeiden tunnistamista varten viljeltiin kolme vertailukantaa SHIBAM-maljalle, joista kanta IHE 53472 tuotti enterohemolysiiniä, kannassa IHE 53471:ssä ei ollut hemolysiinin tuottoa ja kanta IHE 53470 tuotti alfahemolysiiniä (kuva 2, taulukko 4.).

Taulukko 4. Kantojen virulenssigeenit. Kantojen alkuperä Robert Koch Instituutti, Berliini.

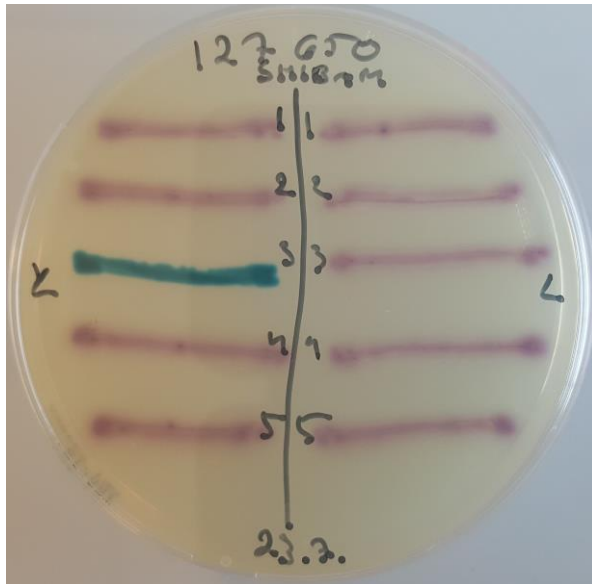
Kanta	Tuotettu hemolyyysi	Virulenssigeenit
IHE 53472	enterohemolyyttinen: enterohemolysiini	stx-, eaeA+, hlyA+
IHE 53471	non-hemolyyttinen: ei hemolysiinin tuottoa	stx-, eaeA-, hlyA-
IHE 53470	betahemolyyttinen: alfahemolyyysi	stx-, eaeA-, hlyA-

Vertailukannat olivat maitoon pakastettuja. Kannat viljeltiin ensin maidosta Drigalski-maljalle ja tehtiin yhdestä pesäkkeestä hyvä hajotusviljely SHIBAM-maljalle ja inkuboitiin yön + 35 °C:ssa. Kasvu maljoilla oli erittäin runsasta (kuva 4.).



Kuva 4. IHE53472 tuotti enterohemolysiiniä, IHE53471 ei ollut hemolysiinin tuottoa, IHE53470 tuotti alfa-hemolysiiniä. Kaikki kannat olivat runsaskasvuisia SHIBAM-maljalla.

SHIBAM-maljoilta poimittiin puutikulla sopivia yksittäisiä pesäkkeitä ja vedettiin viiva pesäkkeestä ORI-maljalle, muodostaen viiden viivan pooleja ja kaksi poolia yhtä maljaa kohden (kuva 5). Maljoja inkuboitiin + 35 °C:ssa yön yli ja seuraavana päivänä pooleista tehtiin PCR. Pipetoitiin steriiliä vettä 500 µl 1,5 ml:n Eppendorf-putkeen ja suspendoitiin tikullinen massaa poolien viivoista, niin että yhdessä putkessa oli massaa viidestä eri viivasta. Seuraavaksi näytteitä vorteksoitiin lyhyesti ja keitettiin 10 minuuttia 100 °C:ssa ja ajettiin PCR-ajo EHEC-ohjelmalla.



Kuva 5. Kuvassa on SHIBAM-maljalta poimituista pesäkkeistä vedettyjä viivoja. K-poolin kolmas viiva on turkoosi ja oletettavasti ei ole EHEC-pesäke, jotka yleensä kasvavat vaaleanpunaisina. Vaaleanpunaiset pesäkkeet voivat olla myös ei-patogeenistä *E. coli*a tai jotain muuta kasvua.

Positiivisten poolien yksittäisistä viivoista toistettiin uudestaan PCR, eli pipetoitiin 500 µl steriiliä vettä 1,5 ml:n Eppendorf-putkeen ja suspendoitiin tikullinen massaa joka viivasta omaan putkeen ja vorteksoitiin lyhyesti. Näytteistä pipetoitiin ennen kuumennusta (10 minuuttia 100 °C) 50 µl ORI-maljalle perämaljaa varten ja tehtiin hyvä hajotusviljely. Maljoja inkuboitii yön yli + 35 °C:ssa.

Positiivisten viivojen perämaljoista tehtiin vielä varmistus-PCR ja poimittiin 1-2 pesäkettä 500 µl steriiliä vettä 1,5 ml:n Eppendorf-putkeen ja vorteksoitiin. Ajettiin EHEC-ohjelma PCR-laitteella. Onnistuneen ajan jälkeen perämaljalta tehtiin vielä aluslasiagglutinaatiot. Agglutinaatiolasille tiputettiin tippa Big-Six-ryhmäseerumia. Tikullinen bakteerimassa suspendoitiin ryhmäseerumitippaan [taulukko 5]. Luotettavan tuloksen saamiseksi lasia käännettiin enintään 30 sekunnin ajan.

Taulukko 5. SSI Diagnostican kaupalliset ryhmäseerumit ja OK-erillisseerumit.

SSI Big-Six-ryhmäseerumi (SSI Diagnostica, Hillerød)	O26, O45, O103, O111, O121 ja O145
SSI OK-erillisseerumit (SSI Diagnostica, Hillerød)	O26, O103, O111, O121, O55 ja O128ab

Positiivisessa tuloksessa maitomainen tippa kirkastuu ja nesteen seassa näkyy hiuta-leita. Big-Six-positiivinen näyte testataan vielä OK-seerumeilla O26, O103, O111 ja O121. Negatiivisen tuloksen näytteet testataan O55- ja O128ab-seerumeilla.

6 Tulokset

Näytteitä oli yhteensä 27 kappaletta, joista seitsemästä saatiin EHEC-bakteeri eristet-tyä SHIBAM-maljalta [taulukko 6]. Näytteistä 21:stä ei saatu EHEC-bakteeria eristettyä ja niistä neljä näytettä jäi massaltaan myös negatiivisiksi [taulukko 7]. Shiga-toksiineja tuottavaa bakteeria saattaa olla näytteessä niin vähän, että se on vaikea löytää maljal-ta, ja pesäkkeitä voi olla vain muutamia tai pesäkkeet ovat voineet jäädä muun kasvun alle.

Taulukko 6. Näytteiden tulokset, joista EHEC-kanta saatiin eristettyä sekaviljelmästä.

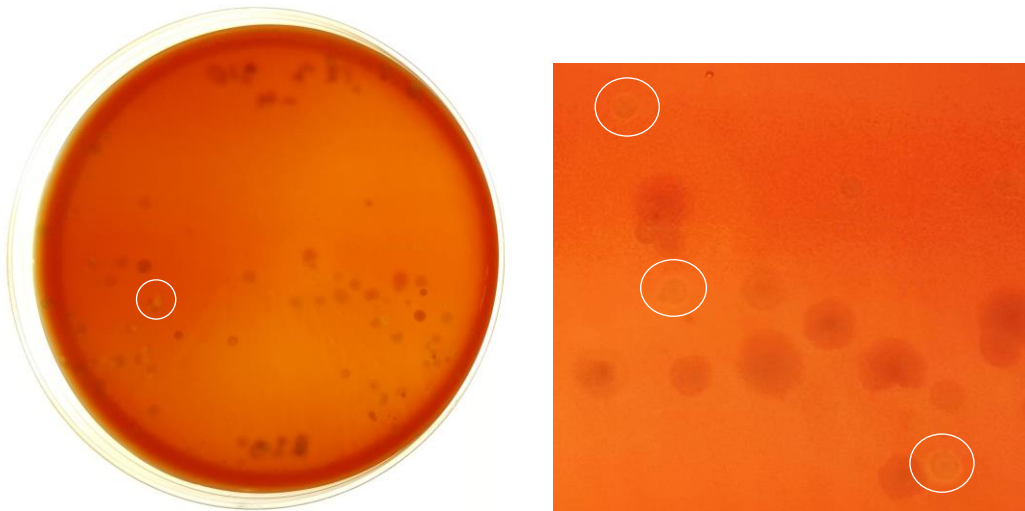
nro.	stx	Ct-arvo ORI-maljan seka- viljelmästä	Ct-arvo perämaljan puhdas- viljelmästä	SHIBAM-malja	sero- tyyppi
9	stx2	26,52	27,86	Tuottaa enterohemolysiiniä	O103
18	stx2f	27,67	27,57	Tuottaa enterohemolysiiniä	O63
19	stx2f	35,70	28,56	Ei enterohemolysiinin tuottoa	O125
20	stx1	24,29	28,46	Tuottaa enterohemolysiiniä	O55
21	stx1	18,18	23,75	Tuottaa enterohemolysiiniä	
	stx2	17,71	22,93		
	O157	18,27	23,68		
22	stx1	21,47	26,63	Tuottaa enterohemolysiiniä	O157:H7
	stx2	20,59	26,69		
	O157	21,87	26,18		
26	stx2f	27,33	21,32	Ei enterohemolysiinin tuottoa	O125

Kuitenkin jos Ct-arvo on edes kohtuullisella tasolla, niin oikea pesäke löytyi jo ensimmäisten tehtyjen poolien aikana ja oli helpommin erotettavissa muusta kasvusta kuin ORI-maljalta.

Taulukko 7. Negatiiviset tulokset joista ei EHEC-bakteeria saatu eristettyä.

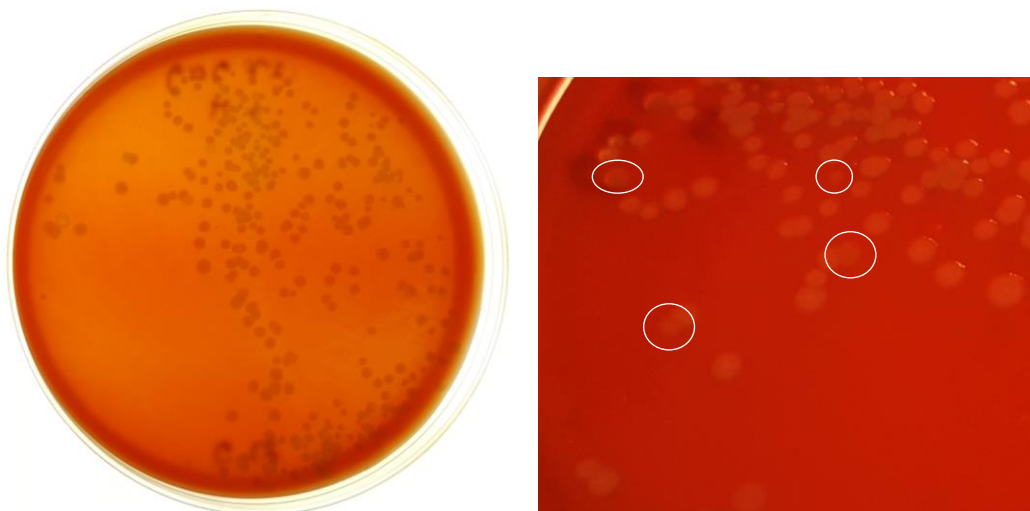
nro.	stx	CT-arvo ORI-malja	SHIBAM –malja
1	stx2	26,32	Seassa tunnistamaton liikkuva bakteeri, joka sotkee maljan
2	stx2	27,36	Ei enterohemolyysiinin tuottoa
3	stx2	25,90	Tuottaa enterohemolysiiniä (vaimea, ei ulkokehää)
4	stx2	31,82	Tuottaa enterohemolysiiniä
5	stx1	23,97	Ei enterohemolyysiinin tuottoa
6	massa neg.	neg.	Ei enterohemolyysiinin tuottoa
7	stx1	35,5	Ei enterohemolyysiinin tuottoa
8	stx1	35,16	Tuottaa alfahemolysiiniä
10	massa neg.	neg.	Ei enterohemolyysiinin tuottoa
11	stx2f	37,46	Ei enterohemolyysiinin tuottoa
12	massa neg.	neg.	Ei enterohemolyysiinin tuottoa
13	massa neg.	neg.	Ei enterohemolyysiinin tuottoa
14	stx2	37,26	Ei enterohemolyysiinin tuottoa
15	stx2f	38,53	Ei enterohemolyysiinin tuottoa
16	stx1	36,15	Ei enterohemolyysiinin tuottoa
17	stx2	39,38	Ei enterohemolyysiinin tuottoa
21	stx2f	39,82	Ei enterohemolyysiinin tuottoa
23	stx2f	37,46	Ei enterohemolyysiinin tuottoa

Pesäkkeiden ulkonäkö ja muoto saattoi vaihdella hyvin paljon eri näytteiden kesken. Kaikki eivät tuottaneet hemolysiä [kuva 7]. Kannattavaa olikin valita mahdollisimman paljon erilaisia pesäkkeitä.



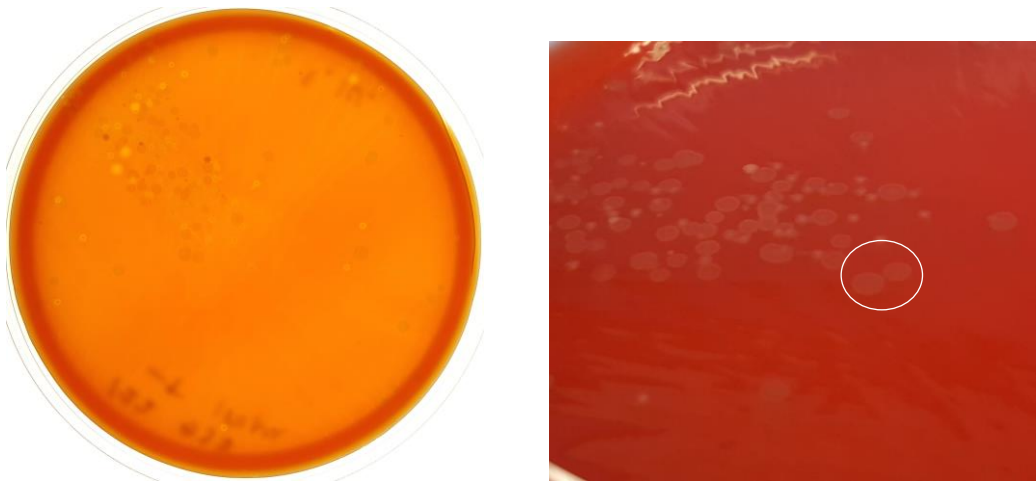
Kuva 6. Näyte 18 oli stx2-positiivinen ja tuotti enterohemolyysiä. Positiivisten pesäkkeiden ympärillä on selkeä kirkas kehä (suurennos oikealla). Maljalla oli myös alfahemolyysiä tuottavia pesäkkeitä jotka olivat negatiivisia.

Näytteet 18 ja 19 olivat molemmat stx2f-positiivisia, mutta vain näyte 18 tuotti enterohemolyysiä. Kuvan 6 suurennoksesta näkyy, että näytteen 18 positiivisten pesäkkeiden ympärillä on selkeä kehä.



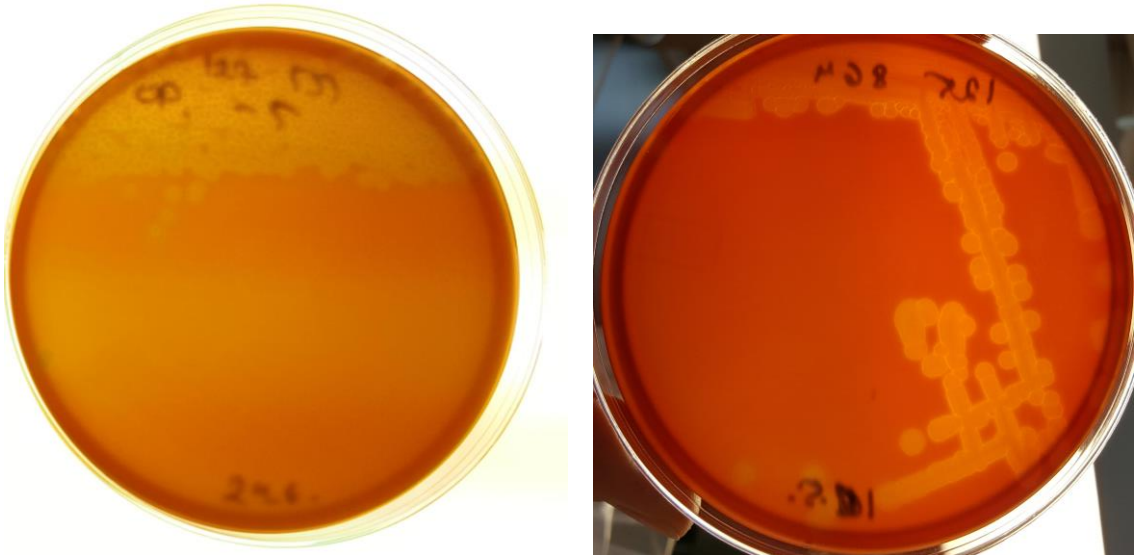
Kuva 7. Näyte 19 oli stx2f-positiivinen eivätkä positiiviset pesäkkeet tuottaneet enterohemolyysiä. Pesäkkeet erosivat kuitenkin muusta kasvusta

Näytteen 19 positiiviset pesäkkeet eivät tuottaneet enterohemolyyysiä [kuva 7]. Positiiviset pesäkkeet olivat harmaita ja ulkoreuna oli koholla, niin että keskellä pesäkettä muodostui kuoppa. Pesäkkeet erosivat muusta vaaleammasta kasvusta.



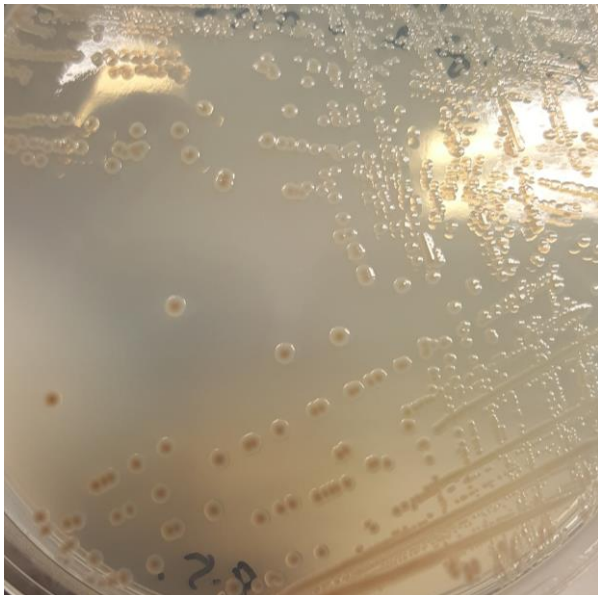
Kuva 8. Näyte 20 oli enterohemolysiiniä tuottava stx_1 -positiivinen serotyyppiä O55 oleva kanta.

Näyte 20 oli enterohemolysiiniä tuottava stx_1 -positiivinen serotyyppiä O55 oleva kanta. Positiivisia pesäkkeitä oli runsaasti, ja ne olivat helposti erotettavissa muusta kasvusta enterohemolyyysin perusteella ja koholla olevasta ulkoreunasta. Seassa oli myös pesäkkeitä, jotka tuottivat enterohemolyyysiä mutta eivät olleet stx_1 -positiivisia. Ne erotti pesäkkeen keskellä olevasta mustasta pisteestä valoa vasten katsottaessa (kuva 8).



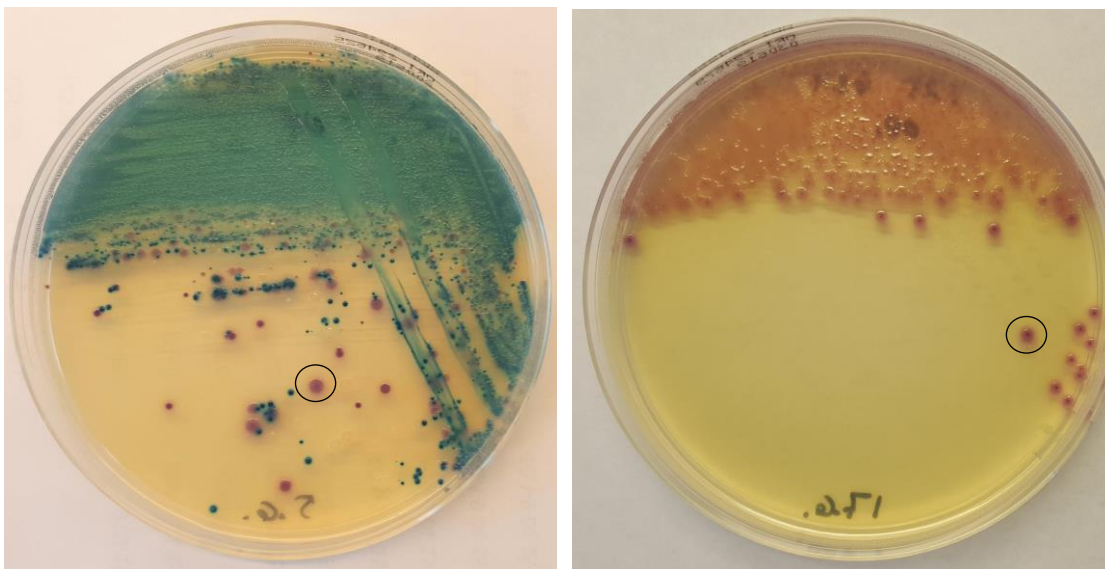
Kuva 9. Kuvassa kaksi kantaa näytteet 21 ja 22, jotka ovat molemmat stx_1 - ja stx_2 -positiivisia sekä O157-positiivisia. Kasvu on hyvin samanlaista molemmissa.

Kannat jotka ovat stx_1 -, stx_2 - ja O157-positiivisia, ovat yleensä hyvin erotettavissa ja kasvavat hyvin runsaana myös STEC-maljalla (kuva 10). Yllä kuvassa 9 on kaksi kantaa, jotka ovat molemmat stx_1 -, stx_2 - ja O157-positiivisia ja enterohemolyttisiä.



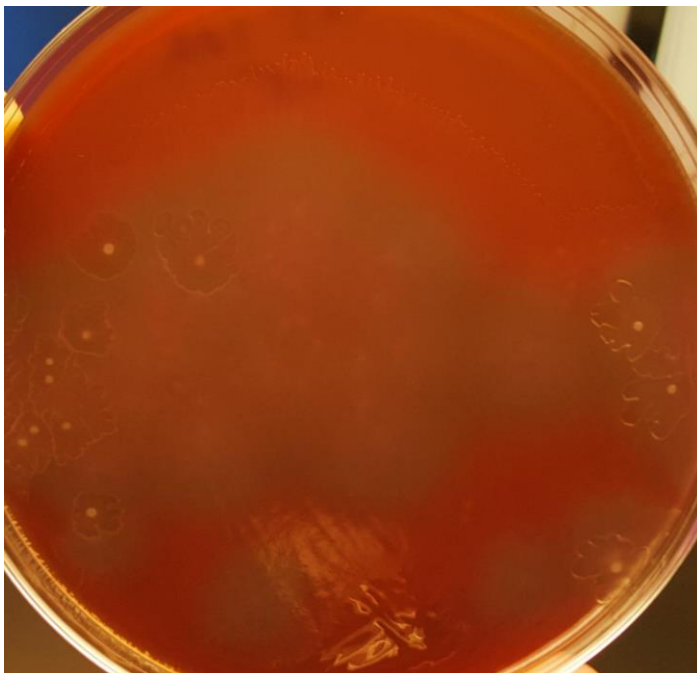
Kuva 10. Kuvassa näkyy positiivisia pesäkkeitä STEC-maljalla. Kyseessä näyte 21 joka on stx_1 - ja stx_2 - ja O157-positiivinen.

EHEC-bakteeri kasvaa STEC-maljalla vaihtelevasti, joko hyvin runsaana tai sitten ei ollenkaan, mutta on helposti erotettavissa muusta kasvusta jos kasvaa runsaana. Kasvu on yleensä selkäreunaisia ja rusehtavia hieman vaaleanpunaiseen sävyisiä pesäkkeitä.



Kuva 11. Näytteet 6 (oik.) ja näyte 10 (vas.) olivat stx-negatiivisia.

Näytteillä 6 ja 10 (kuva 11.) oli negatiivinen stx-negatiivinen massa. Maljalla kasvaa EHEC-pesäkkeitä muistuttavia pesäkkeitä. Kasvu oli todennäköisesti *E. coli* mutta ei Shiga-toksiinia tuottavaa enterohemorraagista *E. coli*.



Kuva 12. Näytteen 1 seassa kasvoi jokin tunnistamaton liikkuva bakteeri.

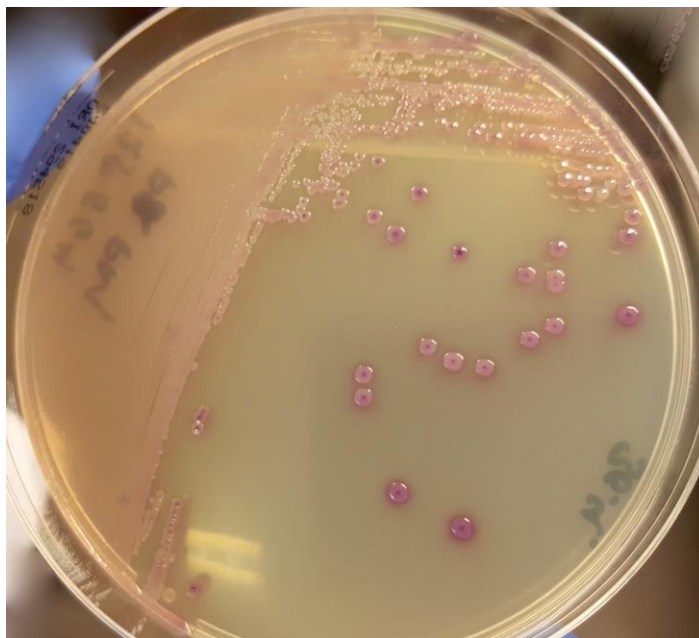
Näytteen 1 massa oli stx_1 -positiivinen ja Ct-arvo oli 26,32, eli hyvä. Seassa kuitenkin kasvoi myös jokin tunnistamaton liikkuva bakteeri, ja se sotki maljan, niin että yksittäisten pesäkkeiden poiminta oli mahdotonta (kuva 13).

7 Loppupäätelmä

Käytännöntyö onnistui hyvin. Aikataulutus oli haasteellista, koska varsinaisen työn yllättävän runsaiden näytemäärien takia oli hankalaa ennakoida, missä välissä pystyisi tekemään opinnäytetyöhön liittyviä näytteitä. Aikaa olisi voinut olla enemmän tekemiseen, koska menetelmä on työläs ja monivaiheinen.

EHEC-pesäkkeiden löytämisessä on edelleenkin omat haasteensa, seassa kasvavien muiden *E. coli* -kantojen takia, jotka muistuttavat kasvultaan EHEC-bakteeria, ja muun kasvun, joka helposti valtasi koko maljan peittäen EHEC-pesäkkeet alleen. tai CT-arvo oli korkea. Kuitenkin EHEC oli helpommin löydettävissä SHIBAM-maljalta kuin ORI-maljalta. Pesäkkeiden ulkonäkö ja muoto oli yhdenmukaisempaa SHIBAM- kuin ORI-maljalla. ORI-maljalla EHEC-pesäkkeet ja ei-toksinen *E. coli* muistuttavat toisiaan, mut-

ta kuitenkin myös EHEC-pesäkkeiden ulkonäkö, jotka ovat samaa kantaa ja samalla maljalla, saattavat vaihdella, kuten alla olevasta kuvasta voi nähdä (kuva 13.).



Kuva 13. Kuvasta näkee hyvin miten paljon samaa kantaa olevien pesäkkeiden ulkonäkö voi vaihdella. maljalla. Kyseessä on yhdestä positiivisesta pesäkkeestä viljelty puhdasviljelmä ORI-maljalla.

Vaikka positiivisia näytteitä oli verrattain vähän, niissä oli kuitenkin hyvin erilaisia kantoja. Työstä sai kattavan kuvan, miltä EHEC-pesäkkeet näyttävät SHIBAM-maljalla ja miten erilaiselta voivat pesäkkeet näyttää eri kannoilla. Työn alkuvaiheissa etsittiin vain vertailukantojen näköistä pesäkettä ja rupesin jo epäilemään SHIBAM-maljan hyödyllisyyttä, kunnes kokeiltiin poimia hyvin erilaisia pesäkkeitä, jotka erosivat selkeästi muusta kasvusta. Positiiviset pesäkkeet löytyivätkin jo ensimmäisten tehtyjen poolien joukosta.

SHIBAM-maljasta olisi varmasti hyötyä oikeiden pesäkkeiden tunnistuksessa ja nopeuttaisi työnkulkua osalla näytteistä. Maljaa voisi jatkossa käyttää niihin näytteisiin, joista saadaan vain positiivinen tulos primäärimaljan massasta eikä yksittäistä positiivista pesäkettä poimittua. Edelleenkin joutuisi tekemään pooloja ja viivoja laimennos-

sarjojen pesäkkeistä mutta oikeat pesäkkeet olisivat helpommin tunnistettavissa kuin ORI-maljalta, jos näytteestä löytyy tarpeeksi Shiga-toksiineja tuottavia pesäkkeitä.

Alkuun SHIBAM-maljan käyttö vaatii lukuisia maljanlukukertoja, jotta oppisi erottamaan oikeat pesäkkeet. Työnkulku pysyy samana kuin ORI-maljalla. Vaikka aikaa saattaa säästää viivojen teon määrässä, niin edelleenkin ei ole mistään pikamenetelmästä kyse. Vielä ei ole tehty päätöstä, otetaanko SHIBAM-malja pysyvästi käyttöön. Itse kuitenkin näkisin maljan hyvänä apuna ennen parempien ja selektiivisempien maljojen ja menetelmien löytymistä.

Lähteet

- 1 EHEC-infektiot Suomessa. 1998. Verkkoaineisto. Duodecim.
<<https://www.duodecimlehti.fi/lehti/1998/3/duo80048>>. Luettu 16.6.2019.
- 2 Shiga-toxin Producing Escheria coli. 2017. Verkkoaineisto.
<https://www.researchgate.net/publication/319655863_Shiga-toxin_Producing_Escherichia_coli_Pathogenicity_Supershedding_Diagnostic_Methods_Occurrence_and_Foodborne_Outbreaks_Shiga-toxin_producing_E_coli>. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety>. Luettu 16.6.2019
- 3 SHIBAM medium. 1996. Verkkoaineisto.
<https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/SHIBAM.htm> Hardy Diagnostics. Luettu 20.6.2019.
- 4 BAM:Diarrheagenic Escheria coli. 2018. Verkkoaineisto.
<<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-diarrheagenic-escherichia-coli>> U.S. Food & Drug Administration. Luettu 20.6.2019.
- 5 Kamylobakteerin, salmonellan, shigellan ja EHEC-bakteerin aiheuttamat suolisto-
tulehdukset. 2018. Verkkoaineisto.
<https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.plain?p_artikkeli=dlk01187>. Lää-
kärikirja Duodecim. Luettu 23.6.2017.
- 6 EHEC-infektiot ja lasten hemolyttis-ureeminen oireyhtymä OYS:ssa 1995-2016.
2019. Verkkoaineisto.
<<https://www.laakarilehti.fi/tieteessa/alkuperaistutkimukset/ehec-infektiot-ja-lasten-hemolyttis-ureeminen-oireyhtyma-oys-ssa-1995-ndash-2016/>>. Lääkärilehti. Luet-
tu 15.7.2019
- 7 Toimenpideohje EHEC-tartuntojen ehkäisemiseksi. 2019. Verkkoaineisto.
<<https://thl.fi/fi/web/infektiotaudit/taudit-ja-mikrobit/bakteeritaudit/ehec/toimenpideohje-ehec-tartuntojen-ehkaisemiseksi>>.
Terveystieteiden tutkimuskeskus. Luettu 17.7.2019.

- 8 1227/2016, Tartuntatautilaki. 2016. Verkkoaineisto.
<<https://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/2016/20161227>>. Finlex. Luettu 17.7.2019.
- 9 Tortora, Funke, Case. 2014. Microbiology An Introduction. Eleventh edition. Pearson. s.760.
- 10 Tiilikainen, Anja S.; Vaara, Martti & Vaheri Antti (toim.). 1996. Lääketieteellinen mikrobiologia. 7. painos. Vammala. Duodecim. s. 380–383.
- 11 Cappucino, Sherman. 2014. Microbiology: A Laboratory Manual. 10. painos. Edinburgh. Pearson Education Limited. s. 453.
- 12 Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure and Function. 2014. Verkkoaineisto.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4270005/>>. NCBI. Luettu 3.7.2019.
- 13 Sharma, Ruchi, Gupta & Aditi. 2014. Differentiation of oral streptococcal species by haemolysis in blood agar medium in vitro. 3. painos. International Journal of Engineering and Advanced Technology. s. 143–144.
- 14 Prevalence of Hemolysin Genes ja Comparison. 2013. Verkkoaineisto.
<<https://aem.asm.org/content/79/20/6301>>. American Society for Microbiology. Luettu 4.8.2019
- 15 Shiga-toxin producing Escheria coli. 2017. Verkkoaineisto.
<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1541-4337.12302>>. Wiley Online Library. Luettu 4.8.2019.
- 16 Polymerase Chain Reaction. 2015. Verkkoaineisto.
<https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/polymerase-chain-reaction>>. Scinece Direct. Luettu 6.8.2019.

Alukkeet ja koettimet

Alukkeet ja koettimet (Integrated DNA Technologies): Stokkiliuoksen (100 µM liuos, TE-puskuriin) säilytys -18 °C, liuottamattomana huoneenlämmössä

stx1+stx2 alukkeet

F_vtx1: TTTGTYACTGTSACAGCWGAAGCYTTACG (29)

F_stx2f_002: TTTGTCACAGTGATAGCAGAAGCTCTGCG (29)

R_vtx1: CCCCAGTTCARWGTRAGRTC MACRTC (26)

stx1 koetin

P_vtx1: /5'6-FAM/ CTGGATGAT/ZEN/CTCAGTGGGCGTTCTTATGTAA /
3IABkFQ/ (31)

stx2 koettimet

P_vtx2/5'6-JOE/ TCGTCAGGC/ZEN/ACTGTCTGAAACTGCTCC/ 3IABkFQ/
(27)

stx2f: P_Stx2f_002: /5Cy5/CC GAC CGG C/TAO/G CTG TCT GAG RCA TCT
CC/3IAbRQSp/ (27)

EHEC-oligomic

Oligot	Loppukonsentraatio reaktiossa (μM)	200 reaktiolle (μl)	500 reaktiolle (μl)
F_vtx1 (100 μM)	0.3	12	30
F_stx2f_002 (100 μM)	0.2	8	20
R_vtx1 (100 μM)	0.3	12	30
F_rfbE (100 μM)	0.2	8	20
R_rfbE (100 μM)	0.2	8	20
P_vtx1 (100 μM)	0.1	4	10
P_vtx2 (100 μM)	0.2	8	20
P_stx2f_002 (100 μM)	0.1	4	10
P_rfbE (100 μM)	0.1	4	10
	oligot yhteensä	68	170
	H ₂ O	132	330
käyttömixiä yhteensä		200	500

Työnkulun kaavio

